

SCIEX Triple Quad™ 4500系统快速检测利福平和利福喷丁中两种亚硝胺类杂质

Rapid Determination of Two Nitrosamine Impurities in Rifampicin and Rifapentine by SCIEX Triple Quad™ 4500 System

陈俊苗, 司丹丹, 龙志敏

Junmiao Chen, Dandan Si, Zhimin Long

SCIEX 应用支持中心, 中国

Key Words: SCIEX Triple Quad™ 4500 System, Nitrosamine Impurities, Rifampicin, Rifapentine

引言

亚硝胺类杂质在药物生产过程中有多种产生原因, 包括药物合成工艺、降解途径及污染引入等, 其能直接或间接损伤细胞DNA, 甚至产生致突变和致癌作用。亚硝胺类杂质特点是在很低的浓度即可造成人体遗传物质的损伤, 因其毒性较强对用药安全性产生了极大的威胁。

利福平和利福喷丁是利福霉素类抗生素, 常常与其他抗生素合用来治疗各种感染, 包括肺结核等分枝杆菌感染。据FDA报道, 在利福平原料的合成中, 起始原料1-氨基-4-甲基哌嗪可在一定条件下产生1-甲基-4-硝基哌嗪 (MNP); 另外利福喷丁原料在合成过程中可能产生1-环戊基-4-硝基哌嗪 (CPNP) 杂质。MNP和CPNP均属于亚硝胺类杂质, 并被归类为可能的人类致癌物。

亚硝胺类杂质在人体中可接受限度较小且药物基质干扰大等因素给方法检测带来了较大的难度。本文开发并验证了一种LC-MS/MS定量方法可同时检测利福平和利福喷丁中的MNP和CPNP两种基因毒性杂质, 方法的检出限和定量限低, 重现性好, 加标回收率合格, 完全满足基因毒性杂质检测需求^[1]。

仪器设备:

SCIEX ExionLC™ AD系统和SCIEX Triple Quad™ 4500系统



图1. SCIEX ExionLC™ AD系统和SCIEX Triple Quad™ 4500系统

对照品溶液制备

分别精密量取MNP和CPNP对照品各适量, 用甲醇定量稀释制成每1 mL中分别约含0.1 ng、0.2 ng、0.5 ng、1 ng、2 ng、5 ng、10 ng、20 ng、50 ng和100 ng、200 ng的混合对照品溶液。

供试品溶液制备

利福平原料药：取本品内容物适量（相当于利福平100mg），精密加纯甲醇10ml，涡旋混匀，振摇2min，高速离心10min，取上清液进液质分析。

利福喷丁原料药：取本品内容物适量（相当于利福喷丁100mg），精密加纯甲醇10ml，涡旋混匀，振摇2min，高速离心10min，取上清液进液质分析。

液相条件

液相系统：SCIEX ExionLC™ AD系统

色谱柱：Ace Ultracore SuperPhenylHexyl, 2.5 μm, 50 x 4.6 mm

流动相：A: 含0.5 mM甲酸铵的水; B: 含0.5 mM甲酸铵的甲醇

流速：0.5 mL/min

柱温：35 °C

进样体积：5 μL

液相梯度：

时间(min)	流速 (mL/min)	A(%)	B(%)
0	0.5	60	40
2	0.5	60	40
6	0.5	0	100
7	1.0	0	100
12	1.0	0	100
13	0.5	0	100
13.1	0.5	60	40
15	0.5	60	40

质谱条件

离子源：ESI, 正离子模式

扫描方式：MRM多反应监测

气帘气CUR: 30 psi

IS电压: 4500 v

源温度 Tem: 450 °C

雾化气Gas1: 65 psi

辅助气Gas2: 45 psi

MRM参数：如表1

表1. 两种基因毒杂质的质谱参数

化合物名称 (Name)	Q1	Q3	RT	DP	CE
1-甲基-4-硝基吡嗪 (MNP)	130.1	100.1	1.4	48	12
1-甲基-4-硝基吡嗪 (MNP)	130.1	58.0	1.4	48	22
1-环戊基-4-硝基吡嗪 (CPNP)	184.0	154.0	4.5	30	12
1-环戊基-4-硝基吡嗪 (CPNP)	184.0	98.0	4.5	30	18

实验结果

灵敏度和线性结果：MNP及CPNP两个杂质的标准曲线信息如图1，两个化合物在0.1ng/mL-200ng/mL线性范围内线性关系良好，两个化合物的线性关系R均大于0.998。LLOQ定量下限0.1ng/mL峰图如图2，6针连续进样测得标准偏差分别为RSD=3.08% (MNP), RSD=1.45% (CPNP)。

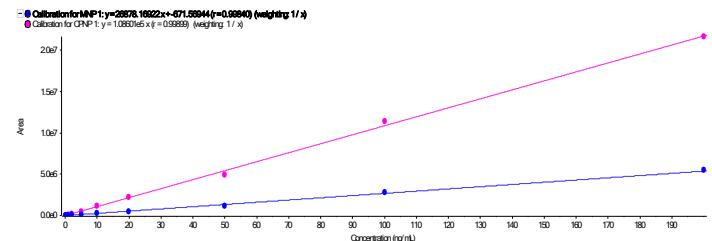


图1. MNP及CPNP的标曲信息

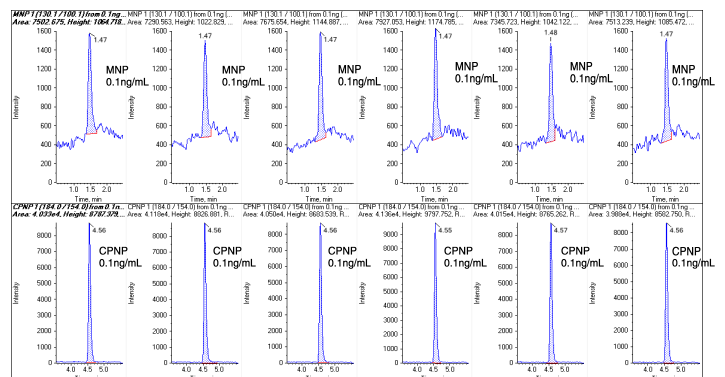


图2. MNP及CPNP杂质0.1ng/mL峰图

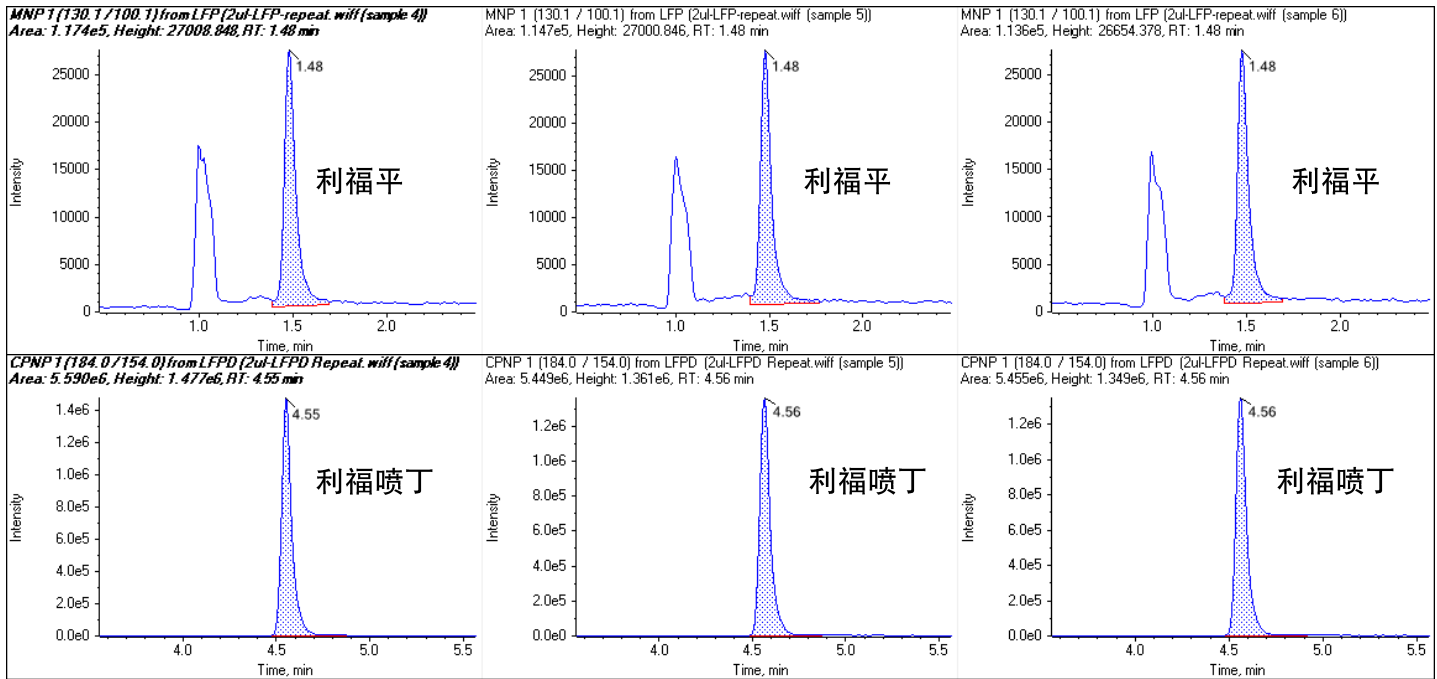


图3. 利福平注射剂中MNP和利福喷丁原料药中CPNP杂质峰图

回收率及重现性结果：图3为利福平注射剂及利福喷丁原料药中两种杂质峰图，利福平注射剂中MNP含量在4.5ng/mL，利福喷丁原料药中CPNP含量为50ng/mL。利福平中加入5ng/mL MNP标液计算回收率为91%，3份样品标准偏差RSD=1.93%；利福喷丁中加入50ng/mL CPNP标液计算回收率为90%，3份样品标准偏差RSD=1.44%。

总结

本文使用SCIEX Triple Quad™ 4500 系统建立了LC-MS/MS方法测定利福平及利福喷丁中MNP和CPNP两种亚硝胺类基因毒的含量。两个杂质在线性范围内线性关系良好，相关系数R大于0.998。加标回收率验证得两个化合物回收率在90%以上，重现性RSD<2%。结果表明该方法灵敏度、重现性及回收率完全满足法规对两个杂质检测的需求^[1]。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-12827-ZH-A

Echo 和 Echo MS是Labcyte, Inc.在美国或其他国家的商标或注册商标，并许可可使用。



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7200
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510-0200
传真: 020-3876-0835
官方微信: [ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)